

**Deteksi *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) –
Metode Quantitative (Real-Time) Reverse Transcription –
Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) menggunakan Hydrolysis
Probe**



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip Umum	2
4 Peralatan	3
5 Bahan	3
6 Prosedur	3
7 Interpretasi Hasil	7
8 Jaminan Mutu	9
Bibliografi	10



Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan budidaya serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di laboratorium acuan dan uji maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Deteksi *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) – Metode *Quantitative (Real-Time) Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) menggunakan *Hydrolysis Probe*.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya, dan telah dibahas melalui rapat teknis serta terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 21 November 2012 di Bogor, yang dihadiri oleh unsur pemerintah, produsen, konsumen, pembudidaya, perguruan tinggi, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya dengan memperhatikan:

1. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.03/Men/2010 tentang Daftar Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK).

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 11 Maret 2013 sampai 10 Mei 2013 dengan hasil akhir RASNI.

Deteksi *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) – Metode Quantitative (Real-Time) Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) menggunakan Hydrolysis Probe

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) dengan metode *quantitative (Real Time) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) menggunakan *Hydrolysis Probe*.

2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dalam dokumen ini, istilah dan definisi berikut ini digunakan.

2.1

amplifikasi

proses penggandaan asam deoksiribonukleat (DNA) secara *in vitro*

2.2

annealing

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

2.3

C_q (quantification cycle)/ C_t (cycle threshold)

titik perpotongan antara kurva amplifikasi kontrol negatif dengan sampel atau titik awal terjadinya kenaikan kurva amplifikasi

2.4

denaturasi

proses pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal

2.5

Deoxyribo Nucleic Acid (DNA)

materi genetik yang tersusun atas nukleotida dengan gula deoksiribosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen (guanin, adenin, sitosin, timin)

2.6

ekstension

proses pemanjangan primer dengan bantuan enzim DNA polymerase, sehingga akan terbentuk 2 buah DNA untai tunggal

2.7

hydrolysis probe

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang dilabel dengan sebuah *fluorophore* secara kovalen pada ujung 5' dan sebuah *quencher* pada ujung 3' yang akan berpendar ketika terjadi proses amplifikasi

2.8

kontrol positif amplifikasi

hasil transkripsi *in vitro* plasmid rekombinan yang mengandung fragmen gen virus

2.9

kontrol negatif amplifikasi

nuclease free water yang diperlakukan sama dengan hasil ekstraksi contoh uji

2.10

kontrol negatif ekstraksi

hasil ekstraksi yang berasal dari *nuclease free water*

2.11

kontrol positif ekstraksi

hasil ekstraksi yang berasal dari organ atau contoh uji yang terinfeksi

2.12

kuantifikasi

pernyataan jumlah satuan dalam angka

2.13

Limit of Detection (LOD)

jumlah *copy* atau molekul target terendah yang masih dapat dideteksi dengan tingkat kepercayaan 95%

2.14

primer

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

2.15

real time PCR

suatu teknik PCR dengan metode analisa yang secara simultan dapat diamati hasil amplifikasinya

2.16

Reverse Transcription (RT)

proses pembentukan DNA komplemen dari RNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase*

2.17

Ribonucleic Acid (RNA)

materi genetik yang tersusun atas nukleotida dengan gula ribosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen (guanin, adenin, sitosin, urasil)

2.18

standar positif

plasmid yang mengandung cDNA virus yang diketahui jumlah *copy*nya

2.19

template

sekuen cDNA/RNA tertentu yang akan diamplifikasi

3 Prinsip Umum

Prinsip dari metode ini adalah mengisolasi dan memurnikan RNA dari organ target /jaringan yang diduga terinfeksi MrNV, dilanjutkan dengan transkripsi balik untuk mensintesis cDNA yang seterusnya diamplifikasi secara *real time*.

4 Peralatan

- a) alat pengukur konsentrasi asam nukleat berbasis UV *Spectrophotometry*;
- b) *freezer* (suhu -20 °C atau lebih rendah);
- c) *heating block* atau *waterbath*;
- d) *laminar air flow*;
- e) mikropipet berbagai ukuran 0,1 µl – 1 000 µl;
- f) *minimixer*;
- g) pinset dan gunting;
- h) *rack ice block*;
- i) *refrigerated centrifuge*;
- j) *spindown centrifuge*;
- k) satu paket mesin *real-time PCR*.

5 Bahan

- a) β -mercaptoethanol;
- b) *Diethyl pyro carbonate* (DEPC) *treated water* atau *RNAse /nuclease free water*;
- c) *ethanol p.a*;
- d) *filtered microtip* berbagai ukuran 10 µl – 1 000 µl;
- e) *isopropanol* (2-propanol);
- f) kit ekstraksi RNA dengan metode *spin column*;
- g) kloroform;
- h) *kit real time PCR* komersial *compatible* dengan *TaqMan probe*;
- i) larutan ekstraksi RNA komersial;
- j) larutan penghambat *RNAse*;
- k) larutan preservatif *RNA*;
- l) *microtube* ukuran 0,2 ml; 1,5 ml – 2 ml;
- m) masker;
- n) plasmid kontrol positif MrNV;
- o) *pellet pestle*/penggerus jaringan;
- p) tabung atau *microplate PCR* optikal ukuran 0,1 ml - 0,2 ml atau tabung kapiler ukuran 20 µl - 100 µl;
- q) sarung tangan (*powder free*);
- r) 1 set primer dan *probe*;
- s) TN Buffer (20 mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl pH 7.4);
- t) Tris EDTA (TE) buffer (konsentrasi 10 mM Tris HCl 1 mM EDTA pH 7.5);
 MrNV2187 Forward: 5'- CAA CTC GGT ATG GAA CTC AAG GT-3'
 MrNV2261 Reverse: 5'- AGG AAA TAC ACG AGC AAG AAA AGT C-3'
 MrNV probe: 5'-FAM-ACC CTT CGA CCC CAG CAA TGG TG-TAMRA-3'

CATATAN 1 bahan disesuaikan dengan metode standar yang digunakan.

CATATAN 2 bisa menggunakan primer dan *TaqMan probe* lainnya yang sudah tervalidasi dan sudah diverifikasi di laboratorium.

6 Prosedur

6.1 Persiapan Contoh Uji

- a. Telur, larva, dan *pasca larva*
 Contoh uji dapat diambil dari seluruh tubuh udang

b. Juvenil sampai dewasa

Contoh uji dapat diambil dari bagian *pleopod*, otot ekor atau insang baik segar maupun beku (-20 °C) atau yang sudah diawetkan dalam larutan gliserol dan etanol absolut dengan perbandingan 20 : 80 atau RNA *latter*.

6.2 Ekstraksi RNA

6.2.1 Metode presipitasi

- gerus 50 mg - 100 mg contoh uji dalam 300 µl TN buffer (20mM Tris/HCl, 0,4 M NaCl, pH 7,4) menggunakan *pellet pestle*.
- sentrifugasi pada 12 000 x g selama 15 menit pada 4 °C .
- pindahkan 150 µl supernatan kedalam *microtube* baru dan tambahkan 1 ml Trizol, dihomogenkan.
- inkubasi selama 5 menit pada 15 °C – 30 °C.
- tambahkan 200 µl kloroform, aduk rata kemudian sentrifugasi pada 12 000 x g selama 15 menit pada 4 °C.
- pindahkan cairan lapisan paling atas (fase air) ke dalam *microtube* baru.
- Tambahkan 2-propanol sebanyak 500 µl.
- inkubasi pada 15 °C – 30 °C selama 10 menit, kemudian sentrifugasi pada 12 000 x g selama 10 menit pada 4°C.
- uang cairan, cuci *pellet* RNA dengan 1 ml *ethanol* 75%, kocok dengan *minimixer* dan sentrifugasi pada 7 500 x g selama 5 menit pada 4°C.
- keringanginkan *pellet* RNA selama 10 menit.
- larutkan *pellet* RNA dengan 50 µl DEPC *water* atau TE buffer menggunakan mikropipet.
- ukur konsentrasi RNA dengan alat pengukur konsentrasi asam nukleat pada panjang gelombang 260 nm (A_{260}).
- lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan.
- periksa kemurnian RNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A_{260}/A_{280}).
- simpan larutan RNA pada -20 °C apabila segera digunakan dan untuk penyimpanan lebih lama pada -80 °C dalam bentuk *aliquot*.

CATATAN 1 prosedur diatas menggunakan TRIzol

CATATAN 2 ekstraksi RNA juga dapat menggunakan kit komersial atau metode standar lainnya

6.2.2 Metode Spin Column

- masukkan 20 mg - 30 mg contoh uji ke dalam *microtube* yang berisi 600 µl buffer RLT (Lysis buffer) yang telah ditambahkan 10 µl β -mercaptoethanol/ml buffer, gerus menggunakan *pellet pestle*.
- sentrifugasi pada 12 000 x g selama 3 menit pada 4°C.
- pindahkan 500 µl supernatan ke dalam *microtube* baru (1,5 ml), tambahkan 500 µl *ethanol* 70%, homogenkan.
- pindahkan 700 µl sampel ke dalam *spin column* di atas *microtube* 2 ml, sentrifugasi selama 15 detik pada 8000 x g. Buang cairan di dalam *microtube*.
- tambahkan 700 µl Buffer RW1 (*wash buffer*) ke dalam *spin column*, sentrifugasi selama 15 detik pada 8 000 x g, buang cairan pada *microtube*.
- tambahkan 500 µl Buffer RPE (*wash buffer*) ke dalam *spin column*, sentrifugasi selama 15 detik pada 8 000 x g.
- tambahkan 500 µl Buffer RPE (*wash buffer*) ke dalam *spin column*, sentrifugasi selama 2 menit pada 8 000 x g.

- h) pindahkan spin column ke dalam *microtube* 1,5 ml yang baru, tambahkan 30 μ l - 50 μ l *RNAse-free water* langsung ke membran *spin column*, sentrifugasi selama 1 menit pada 8 000 x g untuk melarutkan RNA.
- i) ukur konsentrasi RNA dengan alat pengukur konsentrasi asam nukleat pada panjang gelombang 260 nm (A_{260}).
- j) lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan.
- k) periksa kemurnian RNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A_{260}/A_{280}).
- l) simpan larutan RNA pada -20 °C apabila segera digunakan dan untuk penyimpanan lebih lama pada -80 °C dalam bentuk *aliquot*.

CATATAN 1 prosedur diatas menggunakan *Qiagen Rneasy Mini kit*

CATATAN 2 ekstraksi RNA juga dapat menggunakan kit komersial lainnya

6.3 Amplifikasi

6.3.1 OneStep Reverse Transcription PCR

- a) cairkan (*thawing*) RNA template, primer, RT-PCR *master mix*, *RNAse-free water*, dan letakkan di atas es.
- b) buat preparasi *cocktail* sesuai dengan Tabel 1. Siapkan volume *cocktail* 10% lebih banyak dari yang dibutuhkan. Contoh uji yang dianalisa duplo minimal 5% dari total contoh uji.
- c) homogenkan semua bahan *cocktail* dan distribusikan ke masing-masing tabung/*plate* PCR optikal. Masukkan 2 μ l *template* RNA (10 ng - 100 ng) contoh uji, kontrol positif ekstraksi; kontrol negatif ekstraksi, kontrol positif amplifikasi (RNA); kontrol negatif amplifikasi (NTC); dan 4 standar positif (10 *copies*; 10² *copies*; 10³ *copies*; 10⁴ *copies*).
- d) lakukan amplifikasi dengan real time PCR, dengan kondisi sesuai Tabel 2.

CATATAN seluruh proses *preparasi* reagen dilakukan pada kondisi dingin (*on ice*).

Tabel 1 - Komposisi cocktail untuk RT qPCR

No	Komponen	Volume/reaksi	Konsentrasi Akhir
1	RT PCR Master Mix	12,5 μ l	1 x
2	Primer Forward 20 μ M	1 μ l	0,8 μ M
3	Primer Reverse 20 μ M	1 μ l	0,8 μ M
4	Probe 20 μ M	0,25 μ l	0,2 μ M
5	Enzym RT mix	0,25 μ l	
6	<i>RNAse free water</i>	7 μ l	
	Total	23 μl	

CATATAN Komposisi *cocktail* disesuaikan dengan manual kit yang digunakan

Tabel 2 - Profil Amplifikasi

Proses	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
<i>Reverse Transcription</i>	50	10 menit	40
Aktivasi <i>hotstart Taq DNA polymerase</i>	95	5 menit	
<i>Denaturasi</i>	95	10 detik	
<i>Annealing/extention</i>	60	30 detik	
CATATAN profil amplifikasi disesuaikan dengan manual kit dan mesin real time PCR yang digunakan			

6.3.2 Two step Reverse Transcription qPCR

6.3.2.1 Sintesis cDNA

- buat preparasi *cocktail first strand cDNA synthesis* sesuai dengan Tabel 3. Siapkan volume *cocktail* 10 % lebih banyak dari yang dibutuhkan. Contoh uji yang dianalisa *duplo* minimal 5 % dari total contoh uji.
- distribusikan 18 μ l *cocktail* tersebut pada *microtube* ukuran 0,2 ml;
- masukkan 2 μ l *template* RNA (≤ 100 ng) contoh uji, kontrol positif ekstraksi; kontrol negatif ekstraksi dan kontrol positif amplifikasi (RNA).
- inkubasikan pada 60 °C selama 30 menit.

Tabel 3 – Komposisi *cocktail first strand cDNA synthesis*

No	Nama Bahan	Volume (μ l)
1	<i>Random hexamer</i>	1
2	<i>Nuclease free water</i>	10
3	<i>RNase inhibitor</i>	0,5
4	<i>Reverse Transcription buffer</i>	4
5	dNTP	2
6	<i>Reverse transcriptase</i> 20 u/ μ l	0,5
Total		18
CATATAN 1 Protokol di atas menggunakan transkriptor <i>first strand Cdna synthesis kit (Roche)</i>		
CATATAN 2 Sintesis cDNA juga dapat menggunakan reagen sejenis lainnya sesuai protokol yang dianjurkan		

6.3.2.2 Proses Amplifikasi

- cairkan (*thawing*) cDNA, primer, *probe*, PCR *master mix*, *nuclease-free water*, dan letakkan di atas es.
- buat preparasi *cocktail* amplifikasi sesuai dengan Tabel 4. Siapkan volume *cocktail* 10% lebih banyak dari yang dibutuhkan.
- homogenkan semua bahan *cocktail* amplifikasi dan distribusikan ke masing-masing tabung/*plate*/kapiler PCR optikal.
- masukkan 5 μ l *template* cDNA contoh uji, kontrol positif ekstraksi; kontrol negatif ekstraksi, kontrol positif amplifikasi; kontrol negatif amplifikasi (NTC); dan 4 standar positif (10 *copies*; 10² *copies*; 10³ *copies*; 10⁴ *copies*).
- lakukan amplifikasi dengan real time PCR, dengan kondisi sesuai Tabel 5.

CATATAN seluruh proses preparasi reagen dilakukan pada kondisi dingin (*on ice*).

Tabel 4 – Komposisi *cocktail* amplifikasi real time qPCR MrNV

No	Nama Bahan	Volume (μ l)	Konsentrasi Akhir
1	<i>Nuclease free water</i>	8,5	
2	5x Master Mix	4	1 x
3	MrNV F (10 μ M)	1	0,5 μ M
4	MrNV R (10 μ M)	1	0,5 μ M
5	Probe (10 μ M)	0,5	0,25 μ M
Total		15	
CATATAN Komposisi <i>cocktail</i> disesuaikan dengan <i>manual kit</i> yang digunakan			

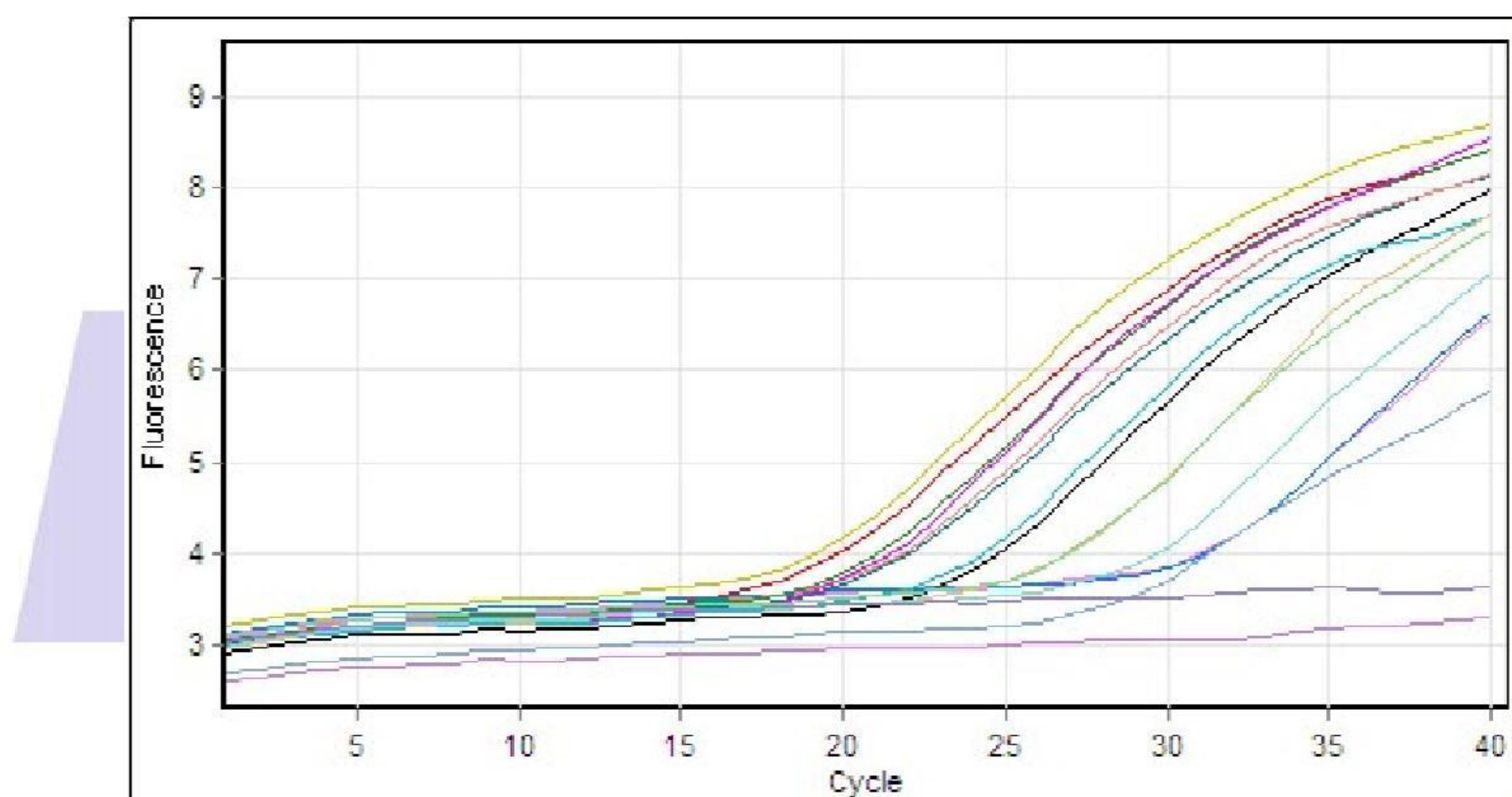
Tabel 5 – Profil Amplifikasi *Two Step Reverse Transcription qPCR*

Proses		Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Hot Start		94	5 menit	1
Amplifikasi	Denaturasi	94	30 detik	50
	Annealing dan Ekstensi	58	30 detik	
Cooling		40	30 detik	1

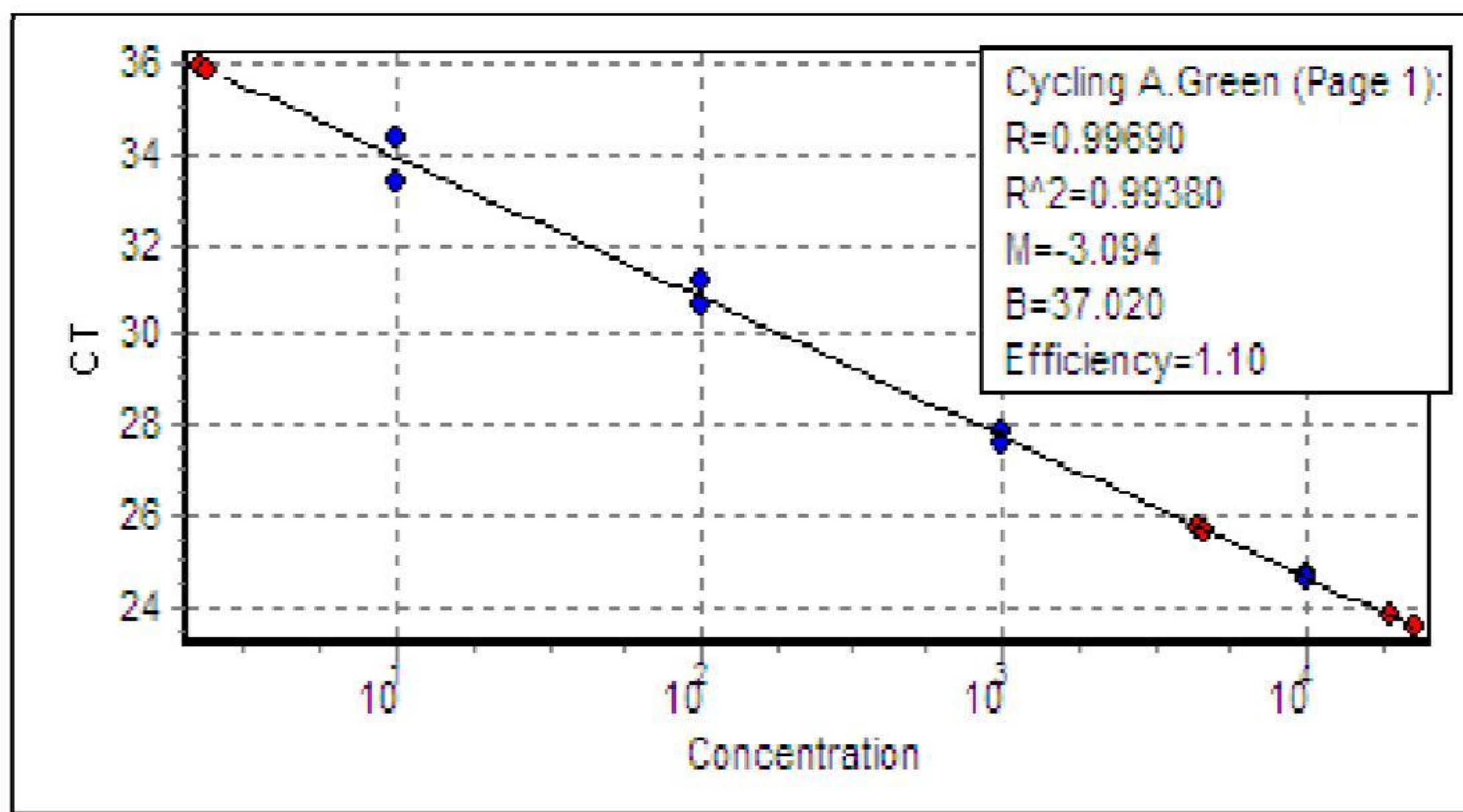
7 Interpretasi Hasil

Lakukan analisis data sesuai dengan *software real time cyclers* yang digunakan.

a) Contoh Pengamatan selama proses *Real Time RT qPCR*



Gambar 1 – Contoh kurva amplifikasi



Gambar 2 - Contoh kurva standar

Interpretasi kurva *amplifikasi real time* PCR adalah sebagai berikut:

- *Threshold/ cut off* ditentukan dengan menarik garis datar yang berada di atas perpotongan antara kontrol negatif amplifikasi dan kontrol negatif ekstraksi dengan kontrol positif ekstraksi dan kontrol positif amplifikasi
- Contoh uji dinyatakan positif apabila terlihat naiknya kurva di atas garis *threshold/cut off* dan nilai C_q lebih kecil atau sama dengan LOD.
- Contoh uji dinyatakan negatif apabila berada dibawah garis *threshold/cut off* dan nilai C_q lebih besar dari LOD dengan tingkat kepercayaan (*confident level*) 95%.

b) Kuantifikasi *copy* virus

- Jumlah *copy* virus dapat dilihat pada tabel laporan kuantifikasi di perangkat lunak komputer yang terhubung dengan mesin *real time* PCR yang digunakan.
- Berdasarkan tabel 6, hasil contoh uji 2 dinyatakan negatif dengan LOD 10 *copies*.

Tabel 6 – Contoh laporan hasil kuantifikasi *copy* virus

No.	Type	Ct	Given Conc (copies/ul)	Calc Conc (copies/ul)	
1	Contoh uji 1a	23,55		2,27E+04	
2	Contoh uji 1b	23,81		1,87E+04	
3	Contoh uji 2a	35,86		2,37E+00	
4	Contoh uji 2b	35,93		2,26E+00	
5	Kontrol positif ekstraksi	25,67		4,65E+03	
6	Kontrol positif amplifikasi	25,74		4,41E+03	
7	Standard 10^4	24,71	1,00E+04	9,52E+03	
8	Standard 10^4	24,56	1,00E+04	1,07E+04	
9	Standard 10^3	27,81	1,00E+03	9,50E+02	

Tabel 6 – (lanjutan)

No.	Type	Ct	Given Conc (copies/ul)	Calc Conc (copies/ul)	
10	Standard 10^3	27,61	1,00E+03	1,10E+03	
11	Standard 10^2	30,68	1,00E+02	1,12E+02	
12	Standard 10^2	31,17	1,00E+02	7,77E+01	
13	Standard 10^1	33,42	1,00E+01	1,46E+01	
14	Standard 10^1	34,12	1,00E+01	1,50E+01	
15	Kontrol negatif ekstraksi				
16	Kontrol negatif ekstraksi				
17	Kontrol negatif amplifikasi				
18	Kontrol negatif amplifikasi				

8 Jaminan Mutu

- proses ekstraksi RNA dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif ekstraksi (PEC) dan kontrol negatif ekstraksi (NEC) dan menunjukkan hasil yang konsisten atau dengan menggunakan *reference gene*.
- hasil ekstraksi RNA mempunyai rasio A_{260}/A_{280} berkisar 1,8 – 2,1.
- proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif amplifikasi (PAC) dan kontrol negatif amplifikasi (NAC) menunjukkan hasil yang konsisten.
- efisiensi amplifikasi dinyatakan baik apabila mempunyai nilai 0,9 – 1,1.
- proses *real time PCR* valid bila dilihat dari kurva standar dengan nilai koefisien determinasi (R^2) > 0,985.
- keterulangan (*Repeatability*) untuk pengujian duplo harus mempunyai nilai standar deviasi (SD) Cq lebih kecil dari 0,5.

Bibliografi

Invitrogen. 2009. Manual of RNA Extraction. TRIzol Invitrogen

OIE. 2009. Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal. Chapter 2.2.6

Qiagen. 2011. Manual; QuantiFast Probe RT-PCR Handbook

Roche. 2010. *Manual Procedure of High Pure Viral Nucleic Acid Kit.*

Roche. 2004. *LightCycler® TaqMan Master Instruction Manual.*

Zhang H., Wang J., Yuan J., Li L., Zhang J., Bonami J.-R. & Shi Z. 2006. Quantitative relationship of two viruses (MrNV and XSV) in white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquatic. Org.*, 71: 11–17.

